

## 論文要旨等報告書

氏	山本 大介
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 3 3 9 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	副甲状腺ホルモン1型受容体アンタゴニストを用いた癌の骨転移制御に関する検討
論文審査委員	教授 飯田 征二    教授 長塚 仁    教授 佐々木 朗

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

癌の骨への転移・骨破壊は骨痛、病的骨折、高カルシウム血症などの骨関連事象の原因となり、患者の QOL を低下させる大きな負の要因である。そのため、癌の骨転移の制御は癌治療における重要な課題である。副甲状腺ホルモン関連蛋白 (parathyroid hormone-related protein : 以下 PTHrP) は肺癌、乳癌、腎細胞癌患者の高カルシウム血症の惹起因子として単離同定され副甲状腺ホルモン1型受容体 (parathyroid hormone 1 receptor : 以下 ; PTH1R) と結合して PTH と同様の生物学的活性を有する。PTHrP は乳癌患者の原発巣では 50~70% 程度に、骨転移巣では 90% 以上に病理組織の免疫組織化学染色の結果から認められる。一方で骨以外の転移部位での PTHrP 発現は 17% 程度と少なく、このことは PTHrP が癌骨転移巣における骨破壊において重要な役割を果たすことを示唆している。

癌の骨転移巣での骨破壊は、癌細胞が直接骨を破壊するのではなく、破骨細胞を介して骨吸収が行われる。破骨細胞性骨吸収によって骨基質から種々の成長因子が放出されるが、その中でも形質転換成長因子(transforming growth factor- $\beta$  : 以下 ; TGF- $\beta$ )は、癌細胞に作用し PTHrP 産生を促進し、PTHrP は骨芽細胞/骨髄間質細胞の PTH1R に結合し RANKL 産生の促進ならびに OPG 産生の抑制によって破骨細胞を活性化し、骨吸収をさらに亢進する。骨転移巣での骨微小環境における"vicious cycle" (悪循環) は癌細胞によって形成され、癌細胞は骨内で増殖・進展を繰り返してゆく。PTHrP はこの悪循環において中心的な役割を果たすことから、PTHrP を分子標的とした治療は癌の骨破壊の制御に有用と考えられる。本研究では経口摂取が可能な薬剤として新規に開発された非ペプチド由来 PTH1R アンタゴニスト JB4365 の乳癌骨転移における癌の骨破壊への効果について検討を行った。

### 【材料ならびに方法】

#### 1. 新規経口 PTH1R アンタゴニスト

JB4365 : 分子量 554 の非ペプチド由来経口 PTH1R アンタゴニストである。James Black Foundation 研究所 (King's College London, UK) により開発され供与を受けた。

#### 2. in vitro における JB4365 の破骨細胞性骨吸収抑制機構に関する検討

1) 細胞増殖に与える影響 : ヒト乳癌細胞株(MDA-MB-231) (以下 MDA-231), マウス骨髄由来骨芽細胞様間質細胞株 ST2 (以下 ST2) 培養液中に 0.1~10 $\mu$ M で JB4365 を添加し, 72 時間後の生細胞数を指標に検討した。

2) ST2 の破骨細胞調節因子への影響 : ST2 の macrophage colony-stimulating factor (以下 M-CSF), receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (以下 RANKL), osteoprotegerin(以下 OPG)に対する JB4365 の影響について RT-PCR 法を用いて検討した。

3) PTHrP による破骨細胞形成に対する影響: 5 週齢雄 C57BL マウスの骨髓から採取した骨髓細胞を PTHrP(10nM)存在下で 7 日間培養し破骨細胞を分化誘導した。破骨細胞形成能に対して, 0.1~10 $\mu$ M の JB4365 を添加し, 酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase 以下: TRAP)陽性多核細胞数を評価した。

### 3. in vivo における JB4365 の骨破壊抑制に関する検討

1) ノードマウス皮下移植腫瘍モデルを用いた検討: 5 週齢雌 BALB/C 系 nu/nu ノードマウスの背部皮下に MDA-231 細胞 (8 $\times$ 10<sup>5</sup> 個) を移植した。JB4365 を 60mg/kg/mouse/day で毎日 28 日まで経口投与し対照群には等量の PBS を投与した。皮下にて増大した腫瘍の体積を評価し, また経時的な体重の変化に関しても検討した。

2) マウス骨転移動物モデルの作製: 4 週齢雌ノードマウスの左心室に MDA-231 細胞 (1 $\times$ 10<sup>5</sup> 個) を播種し乳癌骨転移モデルを用いて検討した。JB4365 を 60mg/kg/mouse/day でマウスに毎日経口投与し, 28 日目に屠殺し癌の骨転移についてエックス線学的・組織学的に検討した。

## **[結果]**

### 1. in vitro における JB4365 の破骨細胞性骨吸収抑制機構に対する効果

In vitro において JB4365 は 0.1~10 $\mu$ M の濃度の範囲で MDA-231 細胞の増殖に影響を与えなかった。破骨細胞形成支持細胞である ST2 に対する JB4365 の効果は RT-PCR の結果から, 濃度依存性に RANKL, M-CSF の発現を抑制し, OPG は発現の回復を認めた。骨髓細胞から破骨細胞を誘導する破骨細胞形成系では, JB4365 は濃度依存的に TRAP 陽性細胞の形成を減少し, 破骨細胞形成を抑制した。

### 2. in vivo における JB4365 骨破壊抑制に対する効果

In vivo において, 皮下移植腫瘍モデルでは JB4365 の連日経口投与は腫瘍の体積に著明な変化を及ぼさなかった。マウスの体重は治療群, 対照群で差を認めなかった。

骨転移モデルにおいて, エックス線学的に骨吸収部位の解析を行ったところ骨吸収量に有意な差を認めた。また, 組織学的に検討した結果からも, 腫瘍の増大に有意差を認め JB4365 を投与した群が腫瘍の増大が抑制され, 骨破壊も少なかった。また, TRAP 染色の結果からも, 対照群では吸収された骨の表面に沿って多数の破骨細胞が存在するのに対し, 治療群では破骨細胞の形成は有意に少なかった。

## **[考察および結論]**

本研究では新規に開発された非ペプチド由来の経口投与可能な PTH1R アンタゴニスト JB4365 について検討した。JB4365 は in vitro において, 破骨細胞形成に関与する ST2 細胞のみならず MDA-231 細胞の増殖を抑制しなかったが, PTHrP による骨髓細胞の破骨細胞への分化誘導を濃度依存性に抑制した。一方 in vivo においては, JB4365 は皮下移植した腫瘍に対して増殖抑制効果を示さなかったにもかかわらず, 骨転移モデルでは JB4365 による破骨細胞形成の抑制ならびに腫瘍の増殖抑制を認め, 癌の骨破壊が抑制された。また JB4365 は PTHrP で刺激した ST2 細胞の RANKL, M-CSF の発現を抑制し, OPG の発現を mRNA レベルで促進することが確認できた。これらの結果から, JB4365 が直接の抗腫瘍効果や骨髓間質細胞への増殖抑制効果はないものの, PTHrP の PTH1R 結合に対して競合的に作用し, その結果 PTHrP による破骨細胞形成ならびに活性化を抑制する効果を持つことが示唆された。

癌の骨転移に関して PTHrP を対象とした治療戦略では, 中和抗体を用いた治療法がマウス骨転移モデルにおいて骨吸収を抑制したとの報告があり, 現在ヒト化された中和抗体が治験段階第二相にある。JB4365 はこれまでに開発された同系統の薬剤とは異なりペプチド構造を持たず, 分子量も 554 と小さい。また, 化学的に合成が可能で経口薬としての使用が可能なほど化学的に安定な特性を持ち, 前述の抗体医療の注射製剤などと比較して医療経済的に有利な特徴を持つ。新規に開発された非ペプチド小分子治療薬である PTH1R アンタゴニストは小分子化合物である特性を生かし経口投与が可能であり, さらに抗体に比べ化学的な合成の簡便さから大量な生産も可能であるなど経済的な長所も併せ持つ。

本研究から JB4365 の有用性が示唆され, 癌骨転移制御に PTH1R アンタゴニストは有効な治療法であることが明らかになった。